

长吻鲢精巢发育的分期及精子的发生和形成^{*}

张耀光 罗泉笙[✓] 钟明超

(西南师范大学生物学系 重庆 630715)

Q959.468

摘要 长吻鲢精巢的发育分为精原细胞增殖期、精母细胞生长期、精母细胞成熟期、精子细胞出现期、精子完全成熟期和精子退化吸收期。精巢的后1/3不产生也不贮存精子,精子的发生和形成经过精原细胞、精母细胞、精子细胞到精子的一系列过程。精原细胞有两种类型。精子无顶体,有中心粒,中片长,核凹窝和线粒体发达,鞭毛具侧鳍。

关键词: 精巢发育, 精子发生, 精子形成, 显微和超微结构, 长吻鲢

长吻鲢 (*Leiocassis longirostris*) 是我国特产的一种淡水鲢类,主要分布于长江中下游及其支流中,具有个体较大,肉味鲜美等特点,历来被视为鱼中珍品。1981年以来,我们已先后获得亲鱼蓄养、人工催情、鱼苗培育和内塘搭配饲养的成功,但人工繁殖中的受精率、孵化率还较低,为解决这些问题,同时也为我国鲢形目鱼类精巢和生殖细胞发育的研究积累资料。我们结合光镜、扫描电镜和透射电镜对长吻鲢精巢发育的特点和精细胞的发生与形成过程进行了观察,现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

雄性幼鱼从人工繁殖的后代中选取,其它各龄雄鱼均捕于嘉陵江合川至北碚段,经科研鱼池短暂蓄养后取材。

光镜 剖开腹部取出整个精巢,分前、中、后三段,分别切取小块组织(幼鱼取整个精巢)投入Bouin氏液中固定24—48小时,石蜡包埋,切片,厚6—8 μm , H. E. 或改良的Mallory氏三色法染色, Nikon显微镜观察并照相,目测微尺计量。

扫描电镜 取约 $1 \times 1 \times 3 \text{ (mm}^3\text{)}$ 大小的精巢组织和挤出的乳白色精液以2.5%戊二醛固定2小时,小块组织经缓冲液洗涤后再用1%的锇酸后固定,另取含少量精子的固定液滴到小块铝箔上,放入保湿度的培养皿内,置冰箱中过夜。二者经系列酒精脱水,临界点干燥,镀金, KYKY 1000B型扫描电镜观察,加速电压5—20KV。

透射电镜 取 1 mm^3 精巢组织经2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定,系列酒精脱水,丙酮置换,国产环氧树脂650聚合包埋, LKB-5 型超薄切片机切片,醋酸氧铀和

^{*} 国家自然科学基金资助项目。

本文1991年4月8日收到,同年9月28日修回。

柠檬酸铅双染色, 用JEM-100CX电镜观察并拍照。

观察结果

1. 精巢发育的组织学期 长吻鲈精巢位于肾脏腹面, 消化道背方, 从前至后高度分支呈指状, 分支上亦有次级分支。左右精巢后部合为一体, 以一共同的输精管开口于泄殖乳突上。合并后的部分呈紫红色, 生殖期间膨大, 约占整个精巢长度的 $1/3$ (图版 I: 1), 该部称作精巢尾区。

就每一分支的纵横切面看, 内部仍属叶型结构, 精巢小叶由许多壶腹组成, 小叶间是小叶间质, 主要由疏松结缔组织、成纤维细胞、Leydig细胞和丰富的微血管构成, 以供给精细胞生长发育所需的营养物质, 在改良的 Mallory 氏法染色中疏松结缔组织被染成深蓝色。

纵观从幼鱼到性成熟雄鱼精巢中生殖细胞的发展变化过程及特点, 将精巢发育划分为6个时期, 不同时期中存在不同发育时期的生殖细胞。

第Ⅰ期: 精原细胞增殖期 该期精巢只见于发育中的幼鱼, 外观细线状, 贴于腹腔背壁, 边缘部有细小齿状突起。内部3—7个精原细胞被薄层结缔组织包裹在一起, 呈不规则型, 壶腹亦不明显。此时精原细胞的特点是: 细胞体积大, 圆形或卵圆形, 直径约 $12.5\text{--}18.75\text{ }\mu\text{m}$, 细胞核位于中央, 嗜碱性极弱, 细胞质无色或淡红色, 核径 $7.5\text{--}10.6\text{ }\mu\text{m}$, 内有1个大核仁, 位于核中央或近一侧, 在大核仁周围有一些点状或短条状的核质构成星网状。核膜清楚, 上面附着有一些颗粒状物质, 核中央略透明。精原细胞排列紧密, 无壶腹腔 (图版 I: 2a, 2b)。精原细胞经过一段时间增殖后, 数量增多, 除大核仁外, 还可见1—2个小核仁, 个别壶腹中央出现壶腹腔雏形。

第Ⅱ期: 精母细胞生长期 精巢略为增宽, 齿状突起变为十分显著的细指状, 血管不明显。壶腹变得明显, 圆形或椭圆形, 每一壶腹中央裂开形成明显的壶腹腔, 初级精母细胞排列在壶腹腔周围, 多为1层, 少数2—3层。细胞圆形或椭圆形, 体积较精原细胞小, 直径 $8.75\text{--}11.25\text{ }\mu\text{m}$, 核径 $5.0\text{--}6.25\text{ }\mu\text{m}$, 核膜仍清晰, 除大核仁外, 有2—3个小核仁。核质亦显著, 嗜碱性略增强 (图版 I: 3a, 3b)。除精巢边缘有少量精原细胞外, 其余均同步发育。

第Ⅲ期: 精母细胞成熟期 Ⅲ期精巢粉红色, 分支更甚, 血管明显, 合并后的部分深红色。壶腹腔扩大, 壶腹壁上可见少量初级精母细胞, 多为初级精母细胞经过第一次成熟分裂后形成的次级精母细胞, 并向壶腹腔推移, 排成4—6层。次级精母细胞染色深, 体积约为初级精母细胞的一半, 直径 $5.0\text{--}6.25\text{ }\mu\text{m}$, 核径 $3.75\text{--}4.40\text{ }\mu\text{m}$, 细胞质比例较小, 核膜变得不明显, 核嗜碱性显著增强, 壶腹腔中央出现少量精子细胞 (图版 I: 4)。整个壶腹表现出明显的发育不同步性。低倍镜下次级精母细胞排成条索状, 核形亦不规则。

第Ⅳ期: 精子开始出现期 Ⅳ期精巢乳白色, 表面血管可辩。壶腹壁已变得很薄, 壶腹边缘空出约成一圈或部分空出, 壶腹腔全被精子细胞占据, 个别壶腹边缘有少量精原细胞及初级精母细胞。细胞核因染色质的浓缩而变圆, 嗜碱性更强, 深兰色, 几乎不

能见细胞质,直径 $2.37-2.50\mu\text{m}$ (图版 I: 5),见不到次级精母细胞,但能见少量发育成熟的精子。

第 V 期:精子完全成熟期 V 期精巢乳白色,各分支十分饱满,无明显血管,挤压亲鱼腹部,没有或仅有少量乳白色精液流出。精子细胞经过变态,长出细长的鞭毛而成为成熟的精子,密集分布,圆颗粒状,直径 $1.5-1.7\mu\text{m}$,被苏木素染为深兰色。在精子较疏处能见不完整鞭毛聚集成丛,对伊红着色。精子细胞变态为成熟的精子时,壶腹壁破裂,精子释放入小叶腔中,连成一片而呈涡旋流动状态(图版 I: 6, 7)。

第 VI 期:精子退化吸收期 参与生殖后的雄鱼精巢血管丰富,并略有萎缩。小叶中的精子部分被排空,壁增厚,结缔组织增多,生精囊又开始进入下一次生长发育(图版 I: 8)。6 月份的成鱼精巢小叶中已有不同发育时期的生殖细胞。

精巢的紫红色部分与前部结构不同,既不产生生殖细胞,也不贮存精子,基本单位是结缔组织与上皮细胞相互连接构成的网眼状小囊。小囊的发育可以分为 3 个时期。发育早期(非繁殖期),囊壁的上皮细胞短柱状,单层或双层,细胞界限清楚,胞质中很少分泌颗粒,细胞端部的刷状缘明显,囊腔中无分泌物(图版 I: 9)。发育中期(繁殖前期),囊壁细胞变为单层高柱状,少数地方间杂有复层扁平细胞,细胞界限模糊,胞质内充满分泌颗粒,细胞核靠近囊腔,椭圆形或近圆形,核膜清晰,有 1 个大核仁,刷状缘更显著,囊腔中开始富积分泌物,整个细胞嗜伊红色。发育晚期(繁殖期),进入繁殖期,精子完全成熟,囊壁上皮细胞破裂、消失、所含分泌颗粒全部释放入囊腔中,只留下结缔组织框架(图版 I: 10)。细胞为全泌型。参与繁殖时,分泌物成为精液的一部分排出体外。

2. 精子的发生和形成 长吻鲈精子的发生始于原始生殖细胞,相继经过精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞阶段,最后发育为成熟的精子。超微结构表明:精原细胞体积最大,核椭圆形,一般可见 1 个大而圆的核仁,核膜清晰,细胞质内有丰富的膜层结构和线粒体,质膜附近有成对的中心粒。根据形态上的差异,可以把精原细胞分为两种类型。I 型精原细胞特征是核卵圆形,位于细胞中央,染色质均匀分散,核膜呈低波状起伏,线粒体相对较少,长条型,内嵴稀少,有丰富的膜层和囊泡状结构,细胞器均匀分散(图版 I: 11)。II 型精原细胞核椭圆形,位于细胞一端,染色质相对浓缩,但不均匀。线粒体多,长型或类球型,内嵴多而明显。囊泡状结构少,而内质网较多,细胞器多集中在细胞一侧(图版 I: 12)。精原细胞经分裂而形成初级精母细胞,刚形成的初级精母细胞椭圆形,体积约为精原细胞的一半,核形不规则,核质电子密度增大,核膜清晰,线粒体和内质网数量比精原细胞少,附着于核膜外周或质膜附近,中心粒向细胞内移动,个别切片上已能见由中心粒伸出的很短的轴丝,相邻细胞间有细胞间桥(图版 I: 13 左)。生长期的初级精母细胞核质致密,细胞器增加且极为活跃(图版 I: 13 右)。接近第一次成熟分裂的初级精母细胞核膜不如早期清晰,染色体成为粗丝状,并进行配对和交换,膜性小泡数量增多,线粒体丰富,但内嵴不明显(图版 I: 14)。初级精母细胞经过第一次成熟分裂后形成两个次级精母细胞,细胞仍为椭圆形,细胞器多集中于细胞一端(图版 I: 15),线粒体减少,高尔基复合体萎缩,细胞很快进行第二次成熟分裂而产生两个精子细胞。精子细胞较小,椭圆形,核质远较次级精母细胞致

密,核膜不清晰,膜性小泡减少。线粒体少,鳍不发达,胞质中仍充满游离核糖体(图版 I: 16)。精子细胞经过一系列的形态变化,成为成熟的精子。变态初期,细胞形状变得不规则,核内染色质逐渐聚合成为颗粒状或短条状,散于核内,核膜不清楚,细胞器逐渐集中。接着近心中心粒向细胞核方向迁移,固着在核凹陷形成的核凹窝内。远心中心粒向后长出鞭毛,鞭毛基部出现囊泡状结构,部分线粒体移至鞭毛两侧(图版 I: 17)。随后中片继续向核内延伸,染色质进一步浓缩,由颗粒状、短条状聚集成密集的板块,少数区域染色质未浓缩而形成核空泡(图版 I: 18)。细胞核略向后延伸而呈椭圆形或向左右扩展而成圆形,鞭毛继续向后伸长。变态近结束时,整个细胞质向后包裹,一部分连同残留的线粒体等细胞器一起脱落,余下一部分包裹着中片和尾部,形成原生质鞘。尾部原生质鞘向两侧扩展而成侧鳍(lateral fin)。细胞间桥完全消失,细胞形态变得规则,核膜、质膜清晰。至此,精子细胞完成变态而成为成熟的精子,被支持细胞推入管腔。

精子圆锥状,分头、中片、尾三部分。头部有圆形或椭圆形两种形态(图版 I: 22),长径 $1.6-2.1\ \mu\text{m}$,大部分被细胞核占据,无顶体,中心粒上方有环状的中心粒帽包裹,中心粒帽与核之间有微丝连接,核凹窝深。中片长,周围有囊泡状结构和大约16个线粒体等细胞器。鞭毛与基体相接处有明显的鞭毛连接区(图版 I: 19-21)。尾极长,达 $51.2\ \mu\text{m}$,横断面为典型的“ $9+2$ ”型双联微管结构,发达的侧鳍总是位于并列的两个中央微管的平行线上(图版 I: 20)。

讨 论

1. 精巢的外形特征 长吻鲢精巢外形最突出的特征是高度分支呈指状,分支上亦有分支,发育中的 I 期精巢亦呈现齿状突起,这可能是鲮科鱼类的共同属性。而鲮形目中鲮科的南方鲮(*Silurus meridionalis*)和鲮(*Silurus asotus*) 胡鲮科的革胡子鲮(*Clarias leather*)等鱼的精巢形态则与大多数硬骨鱼类相近,呈块状,仅外侧缘有少量较短的齿状突起。

2. 精巢发育的分期问题 根据精巢发育的组织学、细胞学特征,将精巢的整个发育过程划分为6个时期,即精原细胞增殖期、精母细胞生长期、精母细胞成熟期、精子开始出现期、精子完全成熟期和精子退化吸收期。在发育的早期和晚期,表现出十分显著的同步性,而在第Ⅱ期晚期和第Ⅳ期早期,发育中的生殖细胞具有非同步性,但到第Ⅳ期晚期,又普遍一律,似乎在这之间存在着一一种发育中的追赶现象。生殖细胞的嗜碱性由弱到强。孵化后86天的幼鱼,精巢细线状,已出现齿状突起,是分支的开始,外观上能区别雌雄,但从组织学切片上看,全部处于精原细胞增殖期。生长到0.45千克的雄性个体,精巢仍为细线状,只是分支增长,生殖细胞仍处于精原细胞增殖期。体重0.95千克时,精巢体积增粗,外形属Ⅱ期,内部细胞绝大部分已发育至精母细胞生长期,壶腹中出现明显的壶腹腔。这与一般鲮科鱼类肉眼不能区分雌雄为第Ⅰ期,能区别雌雄为第Ⅱ期不同。这表明,对于精巢高度分支的鲮科鱼类来说,采用常规的外形分期标准是欠妥的。因此,我们没有按习惯把精原细胞的增殖分为第Ⅰ期和第Ⅱ期,精母细胞的生长

作为第Ⅱ期,而是把精原细胞的增殖划为精巢发育的第Ⅰ期,精母细胞的生长作为第Ⅱ期。以后体重虽然增加,但性腺发育仍停留于第Ⅰ期,第一次性成熟以前才逐步发育为成熟的精子,参与生殖群体的繁殖活动。排精后的雄鱼,精巢略有萎缩,精子很快退化吸收,与此同时,生殖上皮亦重新充血增厚,开始生殖细胞的又一次发生和形成过程。从25个材料看,未排出的精子尚未完全吸收,新的精子细胞已开始形成,即自第一次性成熟后,精巢中周年均有精子存在,只是量和活动程度的差异。

3. 精巢尾区的结构和功能 长吻鲢精巢的后1/3紫红色,不产生也不贮存精子,称该部为精巢尾区。南方鲃、鲃及革胡子鲃等鲃形目鱼类无此结构。构成尾区的上皮细胞经过非繁殖期、繁殖前期和繁殖期3个发育阶段,细胞全泌型。成熟的精子主要位于精巢的前、中段,必须借助体壁肌肉的有力收缩,增加腹压及精巢自身的收缩,才能将精子经过较长的输精管与尾区分泌物一起排出体外。由于结构特殊,每次排出的精子量是有限的,而精子数量少,可能是受精率不高的重要原因。人工很难挤出精液,既是长吻鲢精巢的一大特点,也是人工授精失败的重要因素。

有关精巢尾区的功能,Rastogi (1969)和Yoakim (1976)在研究*Mystus tengara*、*Schilbe mystus*的精巢结构时认为,尾区上皮细胞分泌的粘液物质可为精子的发育提供营养,延长精子的运动时间,同时亦具有贮存精子的作用。而Rosenblum (1987)则认为*Ictalurus nebulosus*精巢尾区绝无贮存精子的作用,上皮细胞的分泌物为糖蛋白复合物,可供成熟精子在输精管内运动的能量。从长吻鲢精巢尾区的结构看,其功能可能与*I. nebulosus*的相似,可以起到供给能量和稀释精子的作用,但其与授精机理有何关系还值得深入研究。

4. 精子发生和形成的特点 长吻鲢精子的发生和形成包含了从精原细胞到成熟精子的一系列变化过程,该过程有如下特点: 1) 精巢内同时存在两种类型的精原细胞,二者的主要差异表现在核的形态和位置,染色质的致密程度,细胞器的多少和发达程度上。一种精原细胞只能进行有丝分裂,以维持精巢内精原细胞的数量,并作为下一个周期的起始细胞;另一种精原细胞继续生长发育,分化为初级精母细胞,并最终形成精子。2) 在精子细胞变态为精子的过程中,核染色质不断浓缩,先后为颗粒状、短条状、最后浓缩成为高电子密度的均质物。随着近心中心粒向核靠近,核膜连同核质内陷而成核凹窝,中心粒最终植入核凹窝中,并向后伸出轴丝,包裹上原生质鞘而形成极长的尾部。核略延长或向外扩展,细胞形态由不规则变为椭圆形或圆型,核膜、质膜恢复至清晰可辨。当除核空泡以外的染色质几乎完全浓缩时,部分细胞质和细胞器脱落,细胞间桥完全消失,精子完全成熟。3) 长吻鲢精子没有顶体,但具有中心粒帽、较长的核和中片,核凹窝极深,线粒体发达,尾长并具发达的侧鳍。这些特征是一般鱼类(如鲤科)精子所不具备的。

致谢 电镜工作得到西南农业大学中心实验室兰景华和西南师大电镜室戴大临同志的协助。

图版说明

图版 I

1. 长吻鲮精巢外形照片, 示一侧及紫红色部分, $\times 2/5$
2. I 期精巢, 示精原细胞, 2a 低倍, $\times 54$; 2b 高倍, $\times 214$
3. II 期精巢示初级精母细胞, 3a 低倍, $\times 54$; 3b 高倍, $\times 214$
4. III 期精巢示次级精母细胞及少量精子细胞, $\times 214$
5. IV 期精巢示精子细胞及少量初级精母细胞和精子, $\times 214$
6. V 期精巢示成熟的精子, $\times 214$
7. V 期精巢低倍图, 小叶内精子成涡旋状, $\times 54$
8. VI 期精巢, 小叶内只剩少量精子, $\times 100$
- 9—10. 精巢后部切片, 上皮细胞发育早期 (9) 和晚期 (10), 该部既不产生也不贮存精子, $\times 214$
11. I 型精原细胞电镜照片, 示高尔基体(G)、线粒体(M)、细胞核(N), $\times 9280$
- 图版 II
12. II 型精原细胞电镜照片, 示中心粒(C)、线粒体(M)、细胞核(N)、滑面内质网(Ser)和囊泡(V), $\times 12240$
13. 刚形成的初级精母细胞 (左) 和生长期的初级精母细胞 (右), Ib: 细胞间桥, N: 细胞核, Ser: 滑面内质网, $\times 9280$
14. 发育晚期的初级精母细胞局部, $\times 12240$
15. 次级精母细胞, N: 细胞核, $\times 12240$
16. 精子细胞局部, N: 细胞核, $\times 12240$
17. 变态早期的精子细胞, 示高尔基体(G)、线粒体(M)、细胞核(N)和轴丝(A), $\times 23000$
18. 变态晚期的精子细胞, 示中心粒(C)、中心粒相(Cc)、微丝(†)、鞭毛连接区(▲)、线粒体(M)、细胞核(N)、质膜(Pm)和滑面内质网(Ser), $\times 30600$
19. 精子纵切, 示中心粒(C)、中心粒相(Cc)、微丝(†)、细胞核(N)、核空泡(●)、线粒体(M)、囊泡(V), $\times 26600$
- 20—21. 精子横切, F: 鞭毛横切及侧鳍, V: 囊泡, N: 细胞核, 20. $\times 9280$; 21. $\times 168000$
22. 精子扫描电镜照片, $\times 4478$

参考文献

- 林鼎, 林浩然, 1984. 鲮繁殖生物学研究 II. 鲮性腺发育的组织学和细胞学研究. 水生生物学集刊, 8 (2): 157—170.
- 施肇芳, 尹伊伟等, 1964. 鲮鱼性腺周年变化的研究. 水生生物学集刊, 5 (2): 77—94.
- 管汀鹭, 黄丹青等, 1990. 金鱼精巢的细胞构造与精子的发生和形成. 水生生物学报, 14 (3): 233—238.
- Afzelius B. A. 1978 Fine structure of the garfish spermatozoon. *J. Ultr. Res.* 64: 309—314.
- Karp G. and Berrill N. J. 1981 Development. 100—116. McGraw-Hill Inc. USA.
- Poirier G. R. and Nicholson N. 1982 Fine structure of the testicular spermatozoa from the channel catfish. *Ictalurus punctatus*. *J. Ultr. Res.* 80: 104—110.
- Rastogi R.K. 1969 Seminal vesicles and sperm duct of an Indian catfish *Mystus tengara* with particular reference to their seasonal cycle. *Acta Anatomica*. 72 (4): 624—639.
- Rosenblum P. M., Pudney J. and Callard I. P. 1987 Gonadal morphology enzyme histochemistry and plasma steroid levels during the annual reproductive cycle of male and female brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *Journal of fish biology*. 31 (3): 325—342.
- Sakai Y. T. 1976 Spermatogenesis of the teleost, *Oryzias latipes* with special reference to the formation of flagellar membrane. *Develop. Grow. and Diff.* 18: 1—13.

Yonkim E. G. 1976 Studies on the seminal vesicles on the Nile catfish, *Schilbe mystus*. Bulletin Faculty of Science Assiut University. 5(1): 107-118.

STUDIES ON THE DEVELOPMENTAL STAGES OF TESTIS, SPERMATOGENESIS AND SPERMATOLEOSIS IN *Leiocassis longirostris*

Zhang Yaoguang Luo Quansheng Zhong Mingchao

(Department of Biology, Southwest China Teachers University, Chongqing 630715)

Optics microscope, scanning and transmission electron microscopy were used to study the spermatogenesis and spermatoleosis as well as ultrastructure of spermatozoon in the Chinese freshwater catfish, *Leiocassis longirostris*. The results were summarized as follows.

1. The testis are separated like fingers in shape. The development of testis may be divided into six stages: 1). multiplication of spermatogonia; 2). growth of spermatocytes; 3). maturation of spermatocytes; 4). initial appearance of spermatozoa; 5). complete maturation of spermatozoa; 6). degeneration of spermatozoa. The posterior portion of the testis are purple and the cells consist of simple columnar epithelium. The purple testis neither produces nor contains the spermatozoa.

2. The spermatogenesis and spermatoleosis are from spermatogonia through the following stages, that is, spermatocytes, spermatids and spermatozoa. The spermatogonia morphologically show different types, that is, type I and type II. In spermatoleosis, the nucleus became condensed. The spermatozoa have no acrosome, but have centriolar cap, long nucleus, long midpiece, a lot of mitochondria and developed lateral fins. The nuclear fossa is very developed too.

Key words: Development of testis, Spermatogenesis, Spermatoleosis, Ultra-structure of germinal cells, *Leiocassis longirostris*

张耀光等：长吻鲢精巢发育的分期及精子的发生和形成

Zhang Yaoguang *et al.* : Studies on the developmental stages of testis, spermatogenesis and spermatoleosis

图版 I *in Leiocassis longirostris*



(图版说明见正文)

